

家蚕醛氧化酶基因 (*BmAOXs*) 的鉴定与表达分析

杨 瑜, 林 英, 杨从文, 王艳霞, 夏庆友*

(西南大学蚕学与系统生物学研究所, 农业部蚕学重点开放实验室, 重庆 400716)

摘要: 醛氧化酶(aldehyde oxidases, AO, EC 1.2.3.1)是属于钼-黄素酶(molybdo-flavoenzymes, MFEs)家族的一类蛋白酶。为了探讨该酶在家蚕 *Bombyx mori* 中的功能,本研究对家蚕醛氧化酶基因(*BmAOXs*)家族进行了鉴定和分析。以其他物种 AO 基因序列检索家蚕全基因组数据库,获得了 8 个 *BmAOX* 候选基因,均具有醛氧化酶保守的功能域。进化分析表明,*BmAOX* 与其他昆虫 AO 聚为一簇。RT-PCR 分析结果显示:*BmAOX1*, *BmAOX2*, *BmAOX3*, *BmAOX5* 具有很强的组织特异性;而 *BmAOX4*, *BmAOX6*, *BmAOX7*, *BmAOX8* 则在蛹和成虫的多个组织中均有表达,提示它们在家蚕生理代谢活动中起重要作用。利用 Native-PAGE 和活性染色方法,对 *BmAOX* 编码的蛋白进行检测,结果表明:家蚕蛹中有 5 种有活性的醛氧化酶,而成虫中有 6 种,各组织中均有有活性的 *BmAOX*,只是种类和活性水平有所不同。本研究结果为深入探讨 *BmAOX* 家族的功能奠定了基础。

关键词: 家蚕; 醛氧化酶; 基因鉴定; 表达特征

中图分类号: Q966 文献标识码: A 文章编号: 0454-6296(2010)01-0001-08

Identification and expression profiling of aldehyde oxidase genes in the silkworm, *Bombyx mori*

YANG Yu, LIN Ying, YANG Cong-Wen, WANG Yan-Xia, XIA Qing-You* (Key Sericultural Laboratory of the Ministry of Agriculture, Institute of Sericulture and Systems Biology, Southwest University, Chongqing 400716, China)

Abstract: Aldehyde oxidases (AO, EC 1.2.3.1) are a group of protease belonging to the large family of molybdo-flavoenzyme (MFE). In order to research the function of these proteases, aldehyde oxidase genes of the silkworm, *Bombyx mori* (*BmAOXs*) were identified and analyzed in this study. Eight candidate genes of *BmAOXs* sharing the conservative domain with aldehyde oxidases from other species were identified based on the silkworm genomic database. Phylogenetic analysis indicated that *BmAOXs* were clustered into a cluster with AO proteins of other insects. The results of RT-PCR analysis showed that *BmAOX1*, *BmAOX2*, *BmAOX3* and *BmAOX5* were highly tissue-specific; *BmAOX4*, *BmAOX6*, *BmAOX7* and *BmAOX8*, however, showed a broad expression profile in different tissues of both pupa and adult, suggesting that they may play important roles in the silkworm metabolism. By Native-PAGE and active staining, five and six active aldehyde oxidases were detected in tissues of pupa and adult of the silkworm, respectively, but they were in different types and activity levels. These results could provide insights into the further functional research on *BmAOX* gene family.

Key words: Silkworm (*Bombyx mori*); aldehyde oxidase; gene identification; expression profiling

醛氧化酶(aldehyde oxidases, AO, EC 1.2.3.1)是一类能催化醛类氧化成相应羧酸并释放出活性氧的蛋白酶(Walker-Simmons *et al.*, 1989; Mendel and Hansch, 2002)。它与黄嘌呤氧化还原酶(xanthine oxidoreductases, XOR)组成了钼-黄素酶(molybdo-flavoenzyme, MFE)家族,具有该家族共

同的结构特征:由两个催化活性互不依赖的相同亚基组成,每个亚基的分子量约为 140~150 kDa,包括 3 个保守的功能结构域:(1)20 kDa 的 N-末端区域,该区域包含两个 2Fe-2S 氧化还原中心;(2)40 kDa 的黄素腺嘌呤二核苷酸(flavine adenine dinucleotide, FAD)结合区,AO 的 FAD 结合区域中

基金项目: 国家教育部“长江学者和创新团队发展计划”项目(IRT0750); 国家“973”计划项目(2005CB121000); 国家自然科学基金项目(30972147)

作者简介: 杨瑜,女,1983年生,重庆人,硕士,主要从事家蚕功能基因组学研究, E-mail: yyu_1223@163.com

* 通讯作者 Corresponding author, E-mail: xiaqy@swu.edu.cn

收稿日期 Received: 2009-09-23; 接受日期 Accepted: 2009-12-18

没有编码烟酰胺腺嘌呤二核苷酸 (nicotinamide adenine dinucleotide, NAD) 结合位点的保守序列, 而这是 XOR 的典型特征 (Garattini *et al.*, 2008); (3) 85 kDa 的 C-末端底物结合区, 它包含一个保守的钼辅因子 (molybdenum cofactor, MoCo) 结合域。

AO 广泛地存在于动植物体内, 是一种具有众多生理生化功能的重要酶类。有关醛氧化酶生理功能的研究报道最早见于植物。植物 AO 被认为在脱落酸 (abscisic acid, ABA) 和吲哚乙酸 (indoleacetic acid, IAA) 合成中起催化作用, 从而参与植物生长、发育和环境适应性等许多方面的调节过程 (Walker-Simmons *et al.*, 1989; Sagi *et al.*, 2002; Gonzalez-Guzman *et al.*, 2004; Seo *et al.*, 2004; Yesbergenova *et al.*, 2005; Barrero *et al.*, 2006)。动物 AO 的研究报道相对于植物要丰富得多。在动物中, AO 被认为参与了体内代谢产物和外源物的氧化降解、视黄酸合成、药物代谢及肝脏中有毒化合物代谢, 与一些人类疾病的病理相关, 其活性水平还成为了医学上临床用药及治疗效果评估的一个重要参数 (Huang and Ichikawa, 1994; Berger *et al.*, 1995; 韩萍和喻书彻, 1995; Wright *et al.*, 1999; Kitamura *et al.*, 2006)。人们对昆虫 AO 功能的研究大多集中在嗅觉的气味分子降解作用上, 这似乎是昆虫 AO 的一种独特功能 (Rybczynski *et al.*, 1989, 1990)。另外, 也有报道称 AO 在库蚊中与杀虫剂抗性相关 (Coleman *et al.*, 2002)。

AO 属于多基因家族, 在不同的物种中基因数量不同。到目前为止, 已经鉴定出或基于基因组序列预测出的醛氧化酶基因日益增多: 如拟南芥 *Arabidopsis thaliana* (Sekimoto *et al.*, 1998)、小鼠 *Mus musculus* (Kurosaki *et al.*, 2004)、灰色短尾负鼠 *Monodelphis domestica*、果蝇 *Drosophila melanogaster* (Garattini *et al.*, 2008) 各有 4 个, 西红柿 *Lycopersicon esculentum* (Min *et al.*, 2000)、豌豆 *Pisum sativum* (Zdunek-Zastocka, 2008)、牛 *Bos taurus* (Calzi *et al.*, 1995) 各有 3 个, 玉米 *Zea mays* (Sekimoto *et al.*, 1997)、红原鸡 *Gallus gallus* (Terao *et al.*, 2006)、狗 *Canis familiaris*、马 *Equus caballus* 各有 2 个, 人类 *Homo sapiens*、黑猩猩 *Pan troglodytes*、斑马鱼 *Danio rerio*、非洲爪蟾 *Xenopus laevis* 仅有 1 个 (Garattini *et al.*, 2008)。Pelletier 等 (2007) 在家蚕基因组数据库中鉴定出了 6 个醛氧化酶基因, 并筛选出了其中两个触角特异表达的醛氧化酶基因 (*BmAox1* 和 *BmAox2*), 推测它们参与性信息素降解, 目的是调控嗅觉刺激强度和持续时间。

2008 年家蚕基因组精细图的完成为 *BmAox* 的鉴定提供了丰富的信息资源。本实验主要应用生物信息学方法鉴定了 8 个家蚕醛氧化酶基因 (*BmAoxs*), 分析了它们与其他物种 AO 基因的进化关系, 并通过 RT-PCR 和 Native-PAGE 活性染色方法检测了 *BmAox* 和 *BmAox* 活性蛋白的组织表达情况。

1 材料和方法

1.1 供试材料

家蚕品种大造 (p50) 由西南大学家蚕基因资源库提供。分别取家蚕化蛹后第 6 天雌雄蛹的头和体壁、中肠、脂肪体及雌蛹卵巢、雄蛹精巢; 家蚕羽化当天雌雄成虫的触角、头、胸、腹、翅及雌成虫卵巢、性信息腺, 雄成虫精巢、脂肪体。取出的各组织器官立即置于无 RNA 酶的离心管中, -80°C 保存备用。

1.2 *BmAox* 的预测

在美国国立生物技术信息中心 (NCBI) (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) 下载其他物种 AO 基因序列和蛋白序列, 与最新的家蚕基因组数据库 SilkDB (<http://silkworm.swu.edu.cn/silkdb/>) 进行 tBLASTn 比对, 获得家蚕 AO 同源序列。再用 NCBI 数据库的 BlastP 程序将找出的同源序列与其他物种 AO 氨基酸序列进行比对, 分析其蛋白结构, 具备 AO 保守结构域的确定为家蚕醛氧化酶候选基因。使用 sim4 在线程序 (<http://phil.univ-lyon1.fr/sim4.php>) 分析所筛选基因的内含子和外显子结构。蛋白质分子量和等电点的预测在 ExPaSy (<http://www.expasy.org/tools/>) 网站进行。

1.3 *BmAox* 的系统发育分析

从 NCBI 的 GenBank 数据库中检索并下载其他物种醛氧化酶的氨基酸序列, 与筛选出的 *BmAox* 氨基酸序列一起用 ClustalX 1.83 软件进行多序列比对。其结果用 PHILYP 软件进行最大简约法构建进化树。以同属于钼黄素酶家族的黄嘌呤脱氢酶 (xanthine dehydrogenase, XDH) 为参照。

1.4 总 RNA 的提取和 cDNA 第 1 链的合成

用 RNA 提取试剂盒 TRIzol (Promega) 提取各组织的总 RNA。cDNA 第 1 链采用 Oligo (dT) 和 M-MLV 反转录酶 (Promega) 按操作说明合成。

1.5 *BmAox* 的 RT-PCR 检测

利用 Primer 5.0 引物设计软件对 *BmAox* 目标基因设计特异引物。选择家蚕肌动蛋白 Actin3 基因 (GenBank 登录号: U49854) 作半定量 RT-PCR 的参照

标准。8 个 *BmAox* 的上下游引物分别如下: *BmAox1s* 5'-ACACGGCACTCAATCTTT-3', *BmAox1as* 5'-AAGTC CAGCAGCTTTTGTT-3'; *BmAox2s* 5'-TATCCCGTCGAAG TTGGT-3', *BmAox2as* 5'-CTGTGGTCATTGCGTTTG-3'; *BmAox3s* 5'-TCCATCAAACAACATAAATCC-3', *BmAox3as* 5'-TTTAGCAGTATCGGTGATTGT-3'; *BmAox4s* 5'-TTCACAT CGGTATTTCCGG-3', *BmAox4as* 5'-GGATCACGTTC CAGTTCCG-3'; *BmAox5s* 5'-ACGGCCATAGCCCGAT GTT-3', *BmAox5as* 5'-CGATTCCTTCGCAAGCACC-3'; *BmAox6s* 5'-GGAAGCCACAGCCATCTTAG-3', *BmAox6as* 5'-CCACGTCGATGTCAGGACTA-3'; *BmAox7s* 5'-GACCAAATAACAGCCGACAT-3', *BmAox7as* 5'-TGCACGCTACTGCCACTT-3'; *BmAox8s* 5'-AACGTACCCGGAGTGATT-3', *BmAox8as* 5'-CGATCCG ATTGCAGTCAA-3'; *Actin3s* 5'-AACACCCCGTCCTG CTCCTG-3', *Actin3as* 5'-GGGCGAGACGTGTGATT TCCT-3'。以不同组织的第 1 链 cDNA 为模板, 分别用各自特异引物对 *BmAox* 进行 PCR 扩增。扩增条件: 94℃ 预变性 2 min; 94℃ 30 s, Ta℃ (54℃ ~ 62℃) 30 s, 72℃ 60 s, 循环 25 次; 72℃ 10 min, 4℃ 保存。反应结束后取 5 μL PCR 产物进行 1% 琼脂糖凝胶电泳检测。

1.6 各组织蛋白样品的提取

称取约 0.1 g 各组织样品于研钵中, 加入液氮, 迅速研磨至粉末状。将粉末转移至离心管中, 加入 500 μL pH 7.4 的 0.1 mol/L 磷酸缓冲液裂解 30 min; 然后, 在 4℃ 下 12 000 rpm 离心 30 min, 取上清, -20℃ 保存备用。临上样前, 将蛋白质提取液真空浓缩 10 倍后上样。

1.7 各组织蛋白样品的 Native-PAGE 及 AO 活性染色

按照 Laemmli (1970) 的方法, 配制碱性 (pH 8.8) 非变性聚丙烯酰胺凝胶。在 4℃ 下, 用 7.5% 的分离胶、3.3% 的压缩胶, 恒电流 (压缩胶为 20 mA, 分离胶为 30 mA) 进行 Native-PAGE。电泳完毕后, 参照 Coleman 等 (2002) 的方法进行 AO 活性染色。将凝胶用 1 × TBE 洗涤 2 次, 每次 10 min; 然后, 加入 50 mL 用 1 × TBE 新配制的 AO 活性染色液 (含 20 mg 氯化硝基四氮唑蓝, 0.8 mg 硫酸吩嗪甲酯, 50 mg 别嘌呤醇, 1 mL 庚醛), 置于摇床上缓慢摇荡染色, 直至蓝色条带出现为止 (整个染色过程须严格避光); 最后用 10% 的乙醇终止染色。

2 结果与分析

2.1 家蚕醛氧化酶候选基因的筛选及结构分析

以已报道的其他物种醛氧化酶基因序列作为搜索靶标, 在家蚕 9 倍数据库中检索发现, 家蚕有较完整的 *BmAox* 同源体 8 个, 参照 Pelletier 的命名, 将这 8 个基因分别命名为 *BmAox1*, *BmAox2*, *BmAox3*, *BmAox4*, *BmAox5*, *BmAox6*, *BmAox7*, *BmAox8*。它们的外显子数、CDS 长度、预测蛋白的氨基酸数目、分子量、等电点如表 1 所示。其中 *BmAox1* 和 *BmAox2* 在 2007 年已有研究报道 (Pelletier *et al.*, 2007)。这 8 个基因中 *BmAox3*, *BmAox7*, *BmAox8* 位于家蚕第 18 染色体的 Bm_nscf2901 上, 且 *BmAox3* 和 *BmAox7* 串联成一簇; *BmAox1*, *BmAox2*, *BmAox4*, *BmAox5*, *BmAox6* 分布于家蚕同一染色体的 Bm_nscf2902 上, *BmAox1* 和 *BmAox2* 也是串联成簇, 除 *BmAox8* 的转录方向相反外, 其余 7 个 *BmAox* 都是同一个转录方向 (图 1)。将筛选出来的 8 个 *BmAox* 编码的蛋白序列在 NCBI 网站进行比对分析, 发现它们均具有钼黄素酶家族典型的结构特征, 以 *BmAox8* 为例 (图 2), 即两个铁硫氧化还原中心 [2Fe-2S], 一个 FAD 结合区域和一个钼辅因子结合区域 (MoCo binding domain)。

2.2 *BmAox* 基因的遗传分析

BmAox 与其他物种醛氧化酶及同属于 MFE 家族的黄嘌呤脱氢酶 (XDH) 所构建的进化树如图 3。8 个 *BmAox* 中 *BmAox1*, *BmAox2*, *BmAox6* 与同属鳞翅目的甘蓝夜蛾 MbAox 聚在一起, *BmAox4*, *BmAox5*, *BmAox3*, *BmAox7*, *BmAox8* 单独聚为一簇, 然后所有鳞翅目 AO 聚在一起, 再与双翅目 AO 聚为一簇。昆虫、植物、脊椎动物 AO 各聚为一簇。XDH 聚为一簇, 与脊椎动物 AO 的进化距离较近。

2.3 *BmAox* 在转录水平的表达特征

根据 *BmAox* 在芯片中的信息, 其主要在蛹后期表达, 所以本实验提取了家蚕化蛹后第 6 天雌雄蛹和羽化当天雌雄成虫各组织的总 RNA, 利用 RT-PCR 方法, 对 8 个 *BmAox* 在各组织器官的转录表达情况进行了检测 (图 4)。以家蚕肌动蛋白 *Actin3* 基因为对照, 结果显示, *BmAox1* 和 *BmAox2* 在雌雄成虫触角中特异表达, 其中 *BmAox1* 在性信息腺也有表达; *BmAox3* 仅在蛹的生殖腺中表达 (卵巢中表达量较高, 精巢中表达极微弱), 成虫期不表达; *BmAox4* 在蛹各组织均表达, 成虫中多个组织极微量表达; *BmAox5* 仅在雌成虫的性信息腺表

达, 蛹中不表达; *BmAox6*, *BmAox7*, *BmAox8* 在 蛹各组织和成虫的多个组织均有表达。

表 1 家蚕醛氧化酶基因 (*BmAox*s)

Table 1 Aldehyde oxidase genes in *Bombyx mori*

基因名称 Gene name	基因编号 Gene no.	外显子数 Number of exons	CDS 长度 (bp) CDS length	氨基酸数目 Number of amino acids	分子量 (kDa) Molecular weight	等电点 pI
<i>BmAox1</i>	BGIBMGA008439	16	3 831	1 276	141.8	6.93
<i>BmAox2</i>	BGIBMGA008440	14	3 387	1 128	126.2	5.18
<i>BmAox3</i>	BGIBMGA008268 BGIBMGA008269	15	3 201	1 113	125.4	6.76
<i>BmAox4</i>	BGIBMGA008418	14	3 438	1 145	129.1	6.11
<i>BmAox5</i>	BGIBMGA008445	12	3 222	1 073	118.5	5.65
<i>BmAox6</i>	BGIBMGA008421	20	3 645	1 214	134.2	6.29
<i>BmAox7</i>	BGIBMGA008268	16	3 708	1 235	136.0	5.53
<i>BmAox8</i>	BGIBMGA008244	16	3 714	1 237	139.1	7.57

BGIBMGA008268 包含 *BmAox7* 整个基因和 *BmAox3* 基因的部分。BGIBMGA008268 contains *BmAox7* and part of *BmAox3*.

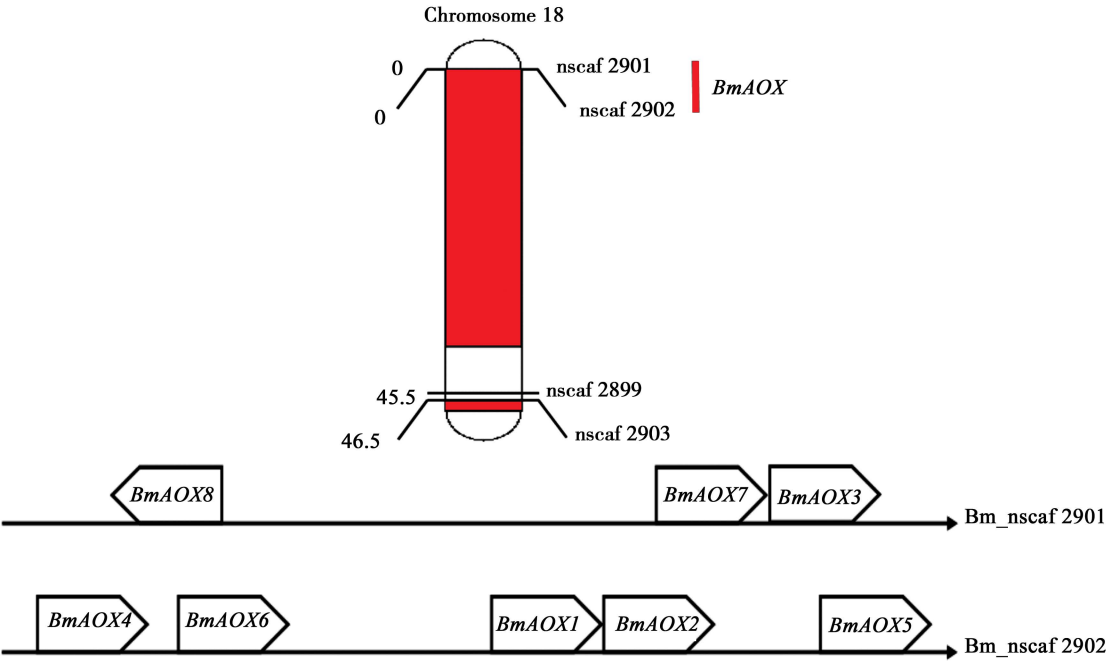


图 1 *BmAox* 染色体定位
Fig. 1 Chromosomal assignment of *BmAox*

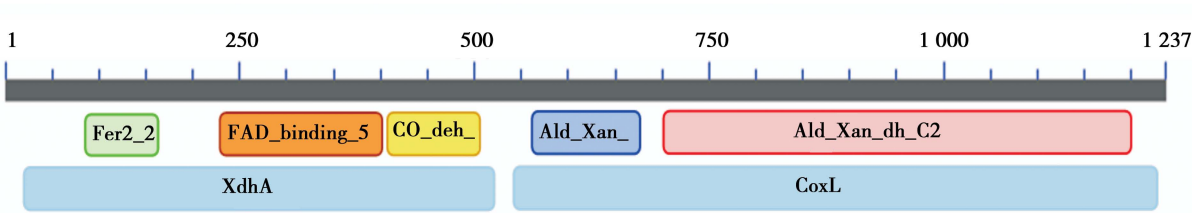


图 2 *BmAox8* 的结构示意图
Fig. 2 The sketch map of *BmAox8* structure

Fer2_2: [2Fe-2S] 结合区域 [2Fe-2S] binding domain; FAD_binding_5: FAD 结合区域 FAD binding domain; Ald_Xan_dh_C2: AO 和 XDH 钼辅因子结合区 Molybdopterin binding domain of aldehyde oxidase and xanthine dehydrogenase.

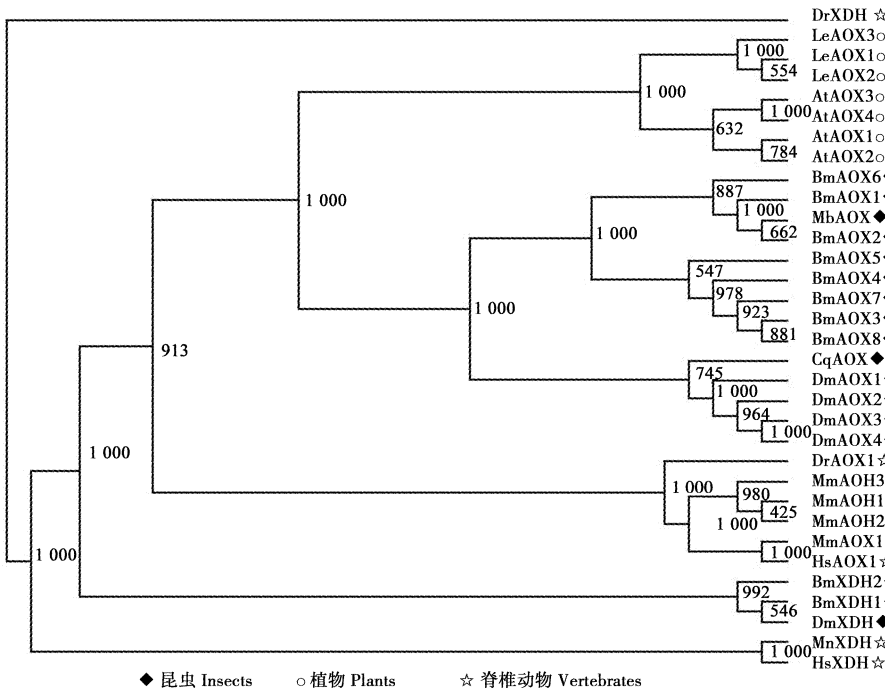


图 3 *BmAox* 的进化分析

Fig. 3 Phylogenetic analysis of *BmAox*

各物种 AO 和 XDH 氨基酸序列登录号如下(物种名称, 蛋白名称, 登录号)GenBank accession numbers of AO and XDH amino acid sequences are as follows (species name, protein name, GenBank accession number): *Homo sapiens*, HsAOX1, NP_001150; *Mus musculus*, MmAox1, NP_033806; MmAoxH1, NP_076106; MmAoxH2, NP_076120; MmAoxH3, NP_001008419; *Danio rerio*, DrAOX1, XP_699030; *Drosophila melanogaster*, DmAox1, AAF55207.1; DmAox2, AAF55208.1; DmAox3, AAF55209.1; DmAox4, AAF55210.1; *Arabidopsis thaliana*, AtAOX1, BAA28624; AtAOX2, BAA28625; AtAOX3, BAA28627; AtAOX4, BAA90299; *Lycopersicon esculentum*, LeAOX1, AAG22605; LeAOX2, AAG22606; LeAOX3, AAG22607; *Mamestra brassicae*, MbAOX, AAY22446; *Culex quinquefasciatus*, CqAOX, AAF87601; *Bombyx mori*, BmAox1, NP_001103812; BmAox2, NP_001103811; *Homo sapiens*, HsXDH, NP_000370; *Mus musculus*, MmXDH, AAI41184; *Drosophila melanogaster*, DmXDH, CAA68409; *Bombyx mori*, BmXDH1, BAA21640; BmXDH2, BAA24290; *Danio rerio*, DrXDH, XP_688983.

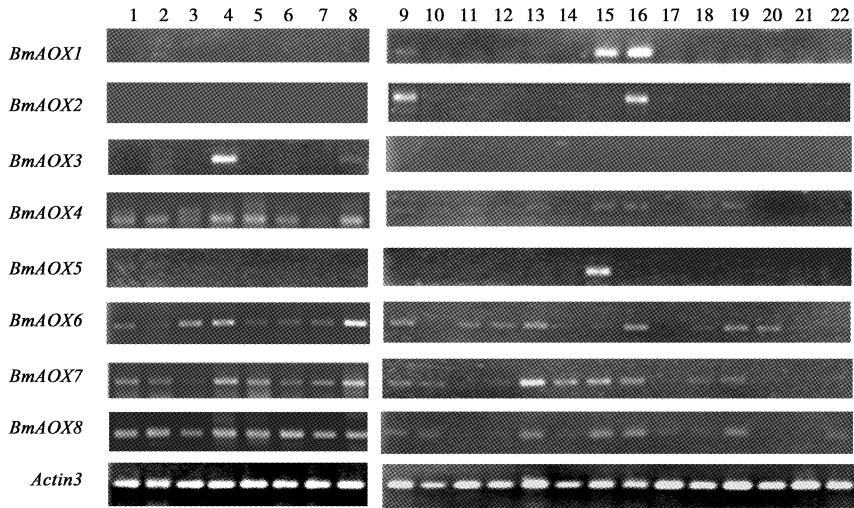


图 4 *BmAox*s 在家蚕不同发育阶段的组织表达谱

Fig. 4 The tissue expression profile of *BmAox*s in different developmental stages of *Bombyx mori*

1-8: 化蛹后第6天雌雄各组织 Male and female tissues of Day 6 after pupation; 9-22: 羽化当天雌雄各组织 Male and female tissues of Day 1 after emergence. 1. 头和体壁 Head and epidermis, ♀; 2. 中肠 Midgut, ♀; 3. 脂肪体 Fat body, ♀; 4. 卵巢 Ovary, ♀; 5. 头+体壁 Head and epidermis, ♂; 6. 中肠 Midgut, ♂; 7. 脂肪体 Fat body, ♂; 8. 精巢 Testis, ♂; 9. 触角 Antennae, ♀; 10. 头 Head, ♀; 11. 胸 Thorax, ♀; 12. 腹 Abdomen, ♀; 13. 翅 Wings, ♀; 14. 卵巢 Ovary, ♀; 15. 性信息腺 Pheromone gland, ♀; 16. 触角 Antennae, ♂; 17. 头 Head, ♂; 18. 胸 Thorax, ♂; 19. 腹 Abdomen, ♂; 20. 翅 Wings, ♂; 21. 精巢 Testis, ♂; 22. 脂肪体 Fat body, ♂.

2.4 BmAox 在蛋白水平的活性特征

用 Native-PAGE 和 AO 活性染色方法检测了家蚕化蛹后第 6 天蛹和羽化当天雌雄成虫各组织器官中醛氧化酶的种类及活性情况(图 5 和 6)。结果显示,在化蛹后第 6 天和羽化当天的雌雄各组织中都检测到 AO 蛋白活性带。其中化蛹后第 6 天的雌蛹中肠和雄蛹的头、体壁、中肠、精巢中活性明显很低且只有 1 条活性带。而雌蛹头和体壁、脂肪体、雄蛹的脂肪体均有 2 种有活性的 AO 蛋白,雌蛹卵巢中有活性的 AO 蛋白种类达 5 种之多。羽化当天雌雄成虫各组织器官中, AO 种类最多的仍是雌性卵巢,其他各组织均为两种,但从条带的迁移度上看,成虫共有 6 种有活性的醛氧化酶。

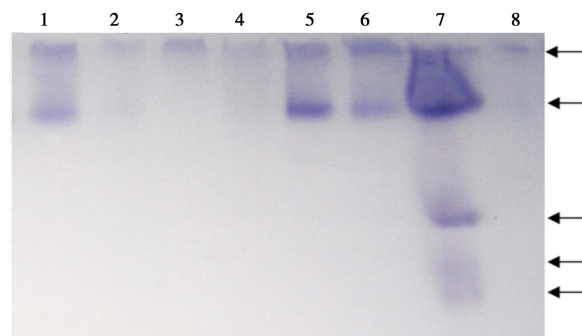


图 5 化蛹后第 6 天雌雄蛹各组织醛氧化酶蛋白检测
Fig. 5 Detection of aldehyde oxidase protein in tissues of *Bombyx mori* pupae at Day 6 after pupation

1. 头和体壁 Head and epidermis, ♀; 2. 头和体壁 Head and epidermis, ♂; 3. 中肠 Midgut, ♀; 4. 中肠 Midgut, ♂; 5. 脂肪体 Fat body, ♀; 6. 脂肪体 Fat body, ♂; 7. 卵巢 Ovary, ♀; 8. 精巢 Testis, ♂.

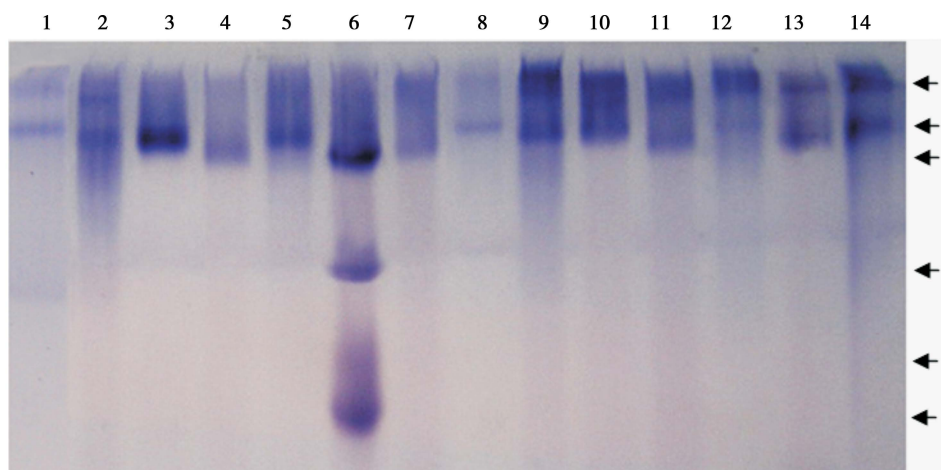


图 6 羽化当天雌雄成虫各组织醛氧化酶蛋白检测

Fig. 6 Detection of aldehyde oxidase protein in male and female tissues of Day 1 after emergence

1. 触角 Antennae, ♀; 2. 头 Head, ♀; 3. 胸 Thorax, ♀; 4. 腹 Abdomen, ♀; 5. 翅 Wings, ♀; 6. 卵巢 Ovary, ♀; 7. 性信息腺 Pheromone gland, ♀; 8. 触角 Antennae, ♂; 9. 头 Head, ♂; 10. 胸 Thorax, ♂; 11. 腹 Abdomen, ♂; 12. 翅 Wings, ♂; 13. 精巢 Testis, ♂; 14. 脂肪体 Fat body, ♂.

3 讨论

醛氧化酶是一种参与机体内众多生理代谢的多基因蛋白家族。Pelletier 等(2007)在家蚕 6 倍基因组数据库中鉴定出了 6 个 *BmAox*。本研究在此基础上,在家蚕 9 倍基因组数据中新筛选到了 2 个 AO 候选基因——*BmAox7*, *BmAox8*, 并对另外 6 个基因信息进行了补充和完善。与小鼠 AO 基因串联成簇的情况一样(Kurosaki *et al.*, 2004),这 8 个 *BmAox* 均位于家蚕第 18 号染色体上,也呈部分串联分布的现象。它们的预测序列含 12~20 个外显子,编码框长 3 201~3 831 bp,预测蛋白含 1 073~1 276 个氨基酸,分子量大小为 118.5~141.8 kDa,

等电点为 5.18~7.57。分析这 8 个 *BmAox* 预测氨基酸残基的保守区域发现,它们均含有醛氧化酶家族的典型结构特征,进一步证实了我们筛选出来的 8 个 *BmAox* 属于醛氧化酶家族。

在进化关系上,大多数研究者(Garattini *et al.*, 2008)赞同 XDH 基因是所有 AO 基因的祖先。基因复制和基因抑制是 AO 进化的原因,它导致了各个物种产生不同的 AO 亚型。AO 基因最初从 XDH 基因进化时,在脊椎动物与昆虫中发生了截然不同的基因复制。本实验绘制了 *BmAox* 与其他物种 AO 和 XDH 的进化树。从进化树可以看出,8 个 *BmAox* 中 *BmAox1*, *BmAox2*, *BmAox6* 与同属鳞翅目的甘蓝夜蛾 *MbAox* 聚在一起, *BmAox4*, *BmAox5*, *BmAox3*, *BmAox7*, *BmAox8* 聚在一

起,证实了 AO 的进化是通过基因复制而来的,*BmAox1* 和 *BmAox2* 可能是 *BmAox6* 的拷贝,*BmAox4*, *BmAox3*, *BmAox7*, *BmAox8* 可能是 *BmAox5* 的复制基因。所有鳞翅目 AO 基因再与双翅目 AO 基因聚为一簇。进化树上 XDH 与 AO 的分支情况证实了 XDH 是所有 AO 的祖先。有趣的是,昆虫 XDH 基因与脊椎动物 XDH 基因的遗传距离要比它与昆虫 AO 基因的遗传距离近,即钼黄素酶家族蛋白在不同物种中的同源性比同物种内的高,进一步证实了醛氧化酶基因复制事件发生在物种分化之前的说法。

目前,关于醛氧化酶的大多数研究表明:AO 在不同物种间、个体不同组织间都存在着转录水平和蛋白活性的极大差异(Terao *et al.*, 2000; Seo *et al.*, 2000; Moriwaki *et al.*, 2001; Asakawa *et al.*, 2008)。本研究绘制了 *BmAox* 在化蛹后第 6 天雌雄蛹和羽化当天雌雄成虫各组织器官的组织表达谱。结果发现 *BmAox1*, *BmAox2* 仅在雌雄成虫触角中特异表达,其中 *BmAox1* 在性信息腺也有表达,这与已有报道的结果一致(Pelletier *et al.*, 2007),它们可能参与嗅觉刺激强度和持续时间的调节。*BmAox3* 仅在蛹期卵巢中高表达,精巢中极微量表达,成虫期不表达,可能与家蚕生殖腺发育相关;*BmAox5* 仅在雌成虫的性信息腺中表达,蛹中不表达,可能参与性信息素的降解。另外,*BmAox4*, *BmAox6*, *BmAox7*, *BmAox8* 在蛹和成虫的多个组织均有表达,说明它们在家蚕生理活动中起着重要的作用。蛹期中,雌性 AO 蛋白比雄性的种类多、活性强。已有研究证明,性激素是 AO 活性的内源调节因子之一,雌激素调节 AO 翻译水平,而雄激素调节它的转录水平(Kurosaki *et al.*, 1999; Terao *et al.*, 2000)。另一个内源调节因子——脂连素通过激活过氧化物酶体增殖物激活受体 α (PPAR- α) 而降低 AO 表达。脂肪量高的生物体,脂连素浓度和 PPAR- α 活性会降低,从而导致 AO 高量表达(Neumeier *et al.*, 2006)。这两种激素可能是雌蛹 AO 种类和活性多于雄蛹的原因。家蚕羽化后,雌雄各组织均有大量 AO 表达,种类也从蛹期的 5 种增加到 6 种。有趣的是,蛹和成虫各组织 AO 蛋白比较发现:卵巢明显比其他组织多出 3 条有活性的蛋白带,提示这些 AO 蛋白在卵巢中行使着特有的功能。我们鉴定出的 8 个 *BmAox* 在家蚕多个或某个组织中都有 mRNA 水平的表达信息,但从蛋白水平看,仅有 5~6 种 AO 活性蛋白。这种

转录水平和蛋白水平的差异在其他物种 AO 研究中也存在,如小鼠 AOX1 在食道和心脏中有 mRNA 表达但却不翻译为有活性的蛋白(Kurosaki *et al.*, 1999)。可见,*BmAox* 可能也存在类似的情况。家蚕醛氧化酶基因的鉴定与表达特征分析为该基因家族功能的探讨奠定了基础,相信随着研究的深入,其生物学功能将逐渐被阐明。

参 考 文 献 (References)

- Asakawa T, Itoh K, Adachi M, Hoshino K, Watanabe N, Tanaka Y, 2008. Properties of 130 kDa subunit of monkey aldehyde oxidase. *Biol. Pharm. Bull.*, 31: 380–385.
- Barrero JM, Rodriguez PL, Quesada V, Piqueras P, Ponce MR, Micol JL, 2006. Both abscisic acid (ABA)-dependent and ABA-independent pathways govern the induction of *NCED3*, *AAO3* and *ABAI* in response to salt stress. *Plant Cell Environ.*, 29: 2 000–2 008.
- Berger R, Mezey E, Clancy KP, Harta C, Wright RM, Repine JE, Brown RH, Brownstein M, Patterson D, 1995. Analysis of aldehyde oxidase and xanthine dehydrogenase/oxidase as possible candidate genes for autosomal recessive familial amyotrophic lateral sclerosis. *Somat. Cell. Mol. Genet.*, 21: 121–131.
- Calzi ML, Raviolo C, Ghibaudi E, de Gioia L, Salmona M, Cazzaniga G, Kurosaki M, Terao M, Garattini E, 1995. Purification, cDNA cloning, and tissue distribution of bovine liver aldehyde oxidase. *J. Biol. Chem.*, 270: 31 037–31 045.
- Coleman M, Vontas JC, Hemingway J, 2002. Molecular characterization of the amplified aldehyde oxidase from insecticide resistant *Culex quinquefasciatus*. *Eur. J. Biochem.*, 269: 768–779.
- Garattini E, Fratelli M, Terao M, 2008. Mammalian aldehyde oxidases: Genetics, evolution and biochemistry. *Cell. Mol. Life. Sci.*, 65: 1 019–1 048.
- Gonzalez-Guzman M, Abia D, Salinas J, Serrano R, Rodriguez PL, 2004. Two new alleles of the abscisic aldehyde oxidase 3 gene reveal its role in abscisic acid biosynthesis in seeds. *Plant Physiol.*, 135: 325–333.
- Han P, Yu SC, 1995. The activity of monoamine oxidase and aldehyde oxidase in iron deficiency anemia. *Journal of Applied Clinical Pediatrics*, 10(2): 104–105. [韩萍, 喻书彻, 1995. 缺铁性贫血单胺氧化酶及醛氧化酶的活性. 实用儿科临床杂志, 10(2): 104–105]
- Huang DY, Ichikawa Y, 1994. Two different enzymes are primarily responsible for retinoic acid synthesis in rabbit liver cytosol. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 205: 1 278–1 283.
- Kitamura S, Sugihara K, Ohta S, 2006. Drug-metabolizing ability of molybdenum hydroxylases. *Drug Metab. Pharmacokin.*, 21: 83–98.
- Kurosaki M, Demontis S, Barzago MM, Garattini E, Terao M, 1999. Molecular cloning of the cDNA coding for mouse aldehyde oxidase: Tissue distribution and regulation *in vivo* by testosterone. *Biochem. J.*, 341: 71–80.

- Kurosaki M, Terao M, Barzago MM, Bastone A, Bernardinello D, Salmons M, Garattini E, 2004. The aldehyde oxidase gene cluster in mice and rats; Aldehyde oxidase homologue 3, a novel member of the molybdo-flavoenzyme family with selective expression in the olfactory mucosa. *J. Biol. Chem.*, 279: 50 482 – 50 498.
- Laemmli UK, 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 227: 680 – 685.
- Mendel RR, Hansch R, 2002. Molybdoenzymes and molybdenum cofactor in plants. *J. Exp. Bot.*, 53: 1 689 – 1 698.
- Min X, Okada K, Brockmann B, Koshiba T, Kamiya Y, 2000. Molecular cloning and expression patterns of three putative functional aldehyde oxidase genes and isolation of two aldehyde oxidase pseudogenes in tomato. *Biochim. Biophys. Acta*, 1 493: 337 – 341.
- Moriwaki Y, Yamamoto T, Takahashi S, Tsutsumi Z, Hada T, 2001. Widespread cellular distribution of aldehyde oxidase in human tissues found by immunohistochemistry staining. *Histopathol.*, 16: 745 – 753.
- Neumeier M, Weigert J, Schaffler A, Weiss TS, Schmidl C, Buttner R, Bollheimer C, Aslanidis C, Scholmerich J, Buechler C, 2006. Aldehyde oxidase 1 is highly abundant in hepatic steatosis and is downregulated by adiponectin and fenofibric acid in hepatocytes *in vitro*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 350: 731 – 735.
- Pelletier J, Bozzolan F, Solvar M, Francois MC, Jacquin-Joly E, Maibeche-Coisne M, 2007. Identification of candidate aldehyde oxidases from the silkworm *Bombyx mori* potentially involved in antennal pheromone degradation. *Gene*, 404: 31 – 40.
- Rybczynski R, Reagan J, Lerner MR, 1989. A pheromone-degrading aldehyde oxidase in the antennae of the moth *Manduca sexta*. *J. Neurosci.*, 9: 1 341 – 1 353.
- Rybczynski R, Vogt RG, Lerner MR, 1990. Antennal-specific pheromone-degrading aldehyde oxidases from the moths *Antheraea polyphemus* and *Bombyx mori*. *J. Biol. Chem.*, 265: 19 712 – 19 715.
- Sagi M, Scazzocchio C, Fluhr R, 2002. The absence of molybdenum cofactor sulfuration is the primary cause of the flacca phenotype in tomato plants. *Plant J.*, 31: 305 – 317.
- Sekimoto H, Seo M, Dohmae N, Takio K, Kamiya Y, Koshiba T, 1997. Cloning and molecular characterization of plant aldehyde oxidase. *J. Biol. Chem.*, 272: 15 280 – 15 285.
- Sekimoto H, Seo M, Kawakami N, Komano T, Desloire S, Liotenberg S, Marion PA, Caboche M, Kamiya Y, Koshiba T, 1998. Molecular cloning and characterization of aldehyde oxidases in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell Physiol.*, 39: 433 – 442.
- Seo M, Aoki H, Koiwai H, Kamiya Y, Nambara E, Koshiba T, 2004. Comparative studies on the *Arabidopsis* aldehyde oxidase (AAO) gene family revealed a major role of AAO3 in ABA biosynthesis in seeds. *Plant Cell Physiol.*, 45: 1 694 – 1 703.
- Seo M, Koiwai H, Akaba S, Komano T, Oritani T, Kamiya Y, Koshiba T, 2000. Absciscic aldehyde oxidase in leaves of *Arabidopsis thaliana*. *Plant J.*, 23: 481 – 488.
- Terao M, Kurosaki M, Barzago MM, Varasano E, Boldetti A, Bastone A, Fratelli M, Garattini E, 2006. Avian and canine aldehyde oxidases: Novel insights into the biology and evolution of molybdo-flavoenzymes. *J. Biol. Chem.*, 281: 19 748 – 19 761.
- Terao M, Kurosaki M, Saltini G, Demontis S, Marini M, Salmons M, Garattini E, 2000. Cloning of the cDNAs coding for two novel molybdo-flavoproteins showing high similarity with aldehyde oxidase and xanthine oxidoreductase. *J. Biol. Chem.*, 275: 30 690 – 30 700.
- Walker-Simmons M, Kudrna DA, Warner RL, 1989. Reduced accumulation of ABA during water stress in a molybdenum cofactor mutant of barley. *Plant Physiol.*, 90: 728 – 733.
- Wright RM, McManaman JL, Repine JE, 1999. Alcohol-induced breast cancer: a proposed mechanism. *Free Radic. Biol. Med.*, 26: 348 – 354.
- Yesbergenova Z, Yang G, Oron E, Soffer D, Fluhr R, Sagi M, 2005. The plant Mo-hydroxylases aldehyde oxidase and xanthine dehydrogenase have distinct reactive oxygen species signatures and are induced by drought and abscisic acid. *Plant J.*, 42: 862 – 876.
- Zdunek-Zastocka E, 2008. Molecular cloning, characterization and expression analysis of three aldehyde oxidase genes from *Pisum sativum* L. *Plant Physiol. Biochem.*, 46: 19 – 28.

(责任编辑: 赵利辉)